製品コード 3660 ～ 3662

研究用

TaKaRa

pSINsi-hH1 DNA（製品コード 3660）
pSINsi-hU6 DNA（製品コード 3661）
pSINsi-mU6 DNA（製品コード 3662）

説明書

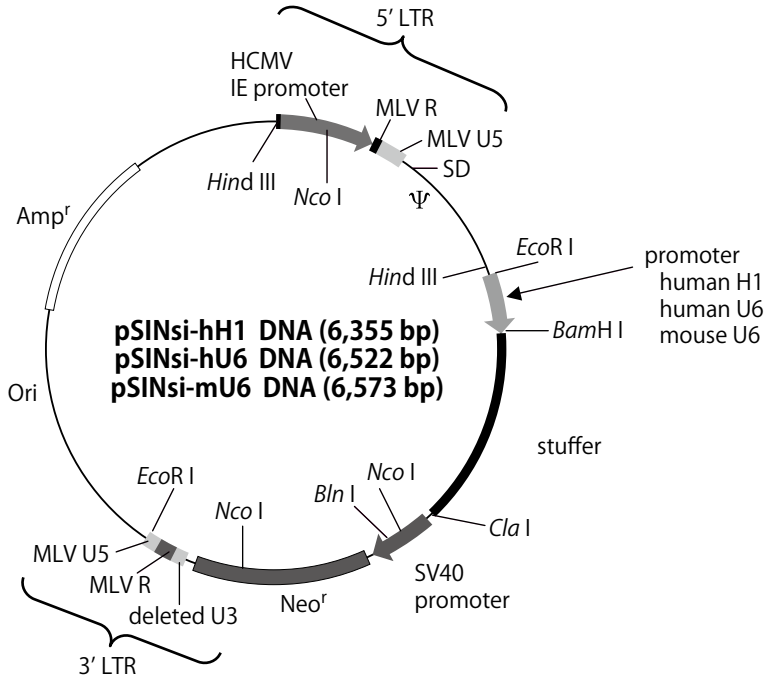
v201510Da

目次

I. 製品説明と原理
II. 保存
III. 準備
　III-1. ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成
　III-2. 標的配列の選択
IV. pSINsi ベクターへのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入
　IV-1. 必要な器具・装置
　IV-2. 用意するもの
　IV-3. 二本鎖オリゴ DNA の調製
　IV-4. ベクターの調製
　IV-5. ライゲーションおよびトランスフォーメーション
　　IV-5-1. DNA 溶液の調製
　　IV-5-2. ライゲーション
　　IV-5-3. トランスフォーメーション
　IV-6. インサートの確認
　IV-7. プラスミド DNA の大量調製
V. レトロウイルスベクターの産生（Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho を使用）
　V-1. 必要な器具・装置および用意するもの
　V-2. ウイルス産生
　V-3. ウイルス力価測定
VI. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験
　VI-1. 必要な器具・装置（VI-2、VI-3 共通）
　VI-2. RetroNectin® を用いる場合
　　VI-2-1. 用意するもの
　　VI-2-2. 準備
　　VI-2-3. 感染
　VI-3. ポリブレンを用いる場合
　　VI-3-1. 用意するもの
　　VI-3-2. 準備
　　VI-3-3. 感染
　VI-4. 遺伝子導入細胞の選択
VII. 関連製品
VIII. 参考文献
IX. 注意

I. 製品説明と原理

遺伝子発現を抑制するひとつの手法として RNA 干渉作用（RNA interference；RNAi）があります。RNAi は二本鎖 RNA を導入することにより、標的遺伝子の mRNA を分解し、発現を抑制する手法で、哺乳類細胞では 21 ～ 23 塩基の短い二本鎖 RNA（short interfering RNA; siRNA）によって RNAi 効果が得られることが明らかとなっています。RNAi 実験の主な手法としては、合成 siRNA を導入する方法と、発現ベクターを用いて細胞内で siRNA を形成させる方法が挙げられます。合成 siRNA ではその RNAi 効果は一過性ですが、発現ベクターを用いることで RNAi 効果の持続が期待でき、特に発現ベクターを用いて安定導入細胞を獲得すると、長期間にわたり遺伝子の発現抑制が可能となります。
レトロウイルスベクターは目的遺伝子を感染細胞染色体に安定に組み込むことができるため、目的遺伝子の長期安定発現ベクターとして非常に有効です。pSINsi ベクターシリーズは、自己不活型レトロウイルスベクタープラスミドを基本骨格とし、RNA polymerase III（pol III）系のプロモーターによりヘアピン型 RNA を発現させるベクターです。pol III 系のプロモーターの下流のクローニングサイトにヘアピン型 RNA を発現させるための合成オリゴ DNA 配列を挿入することによって、siRNA 発現レトロウイルスベクタープラスミドが得られます。マーカー遺伝子としてはネオマイシン耐性遺伝子を搭載しています（下図参照）。

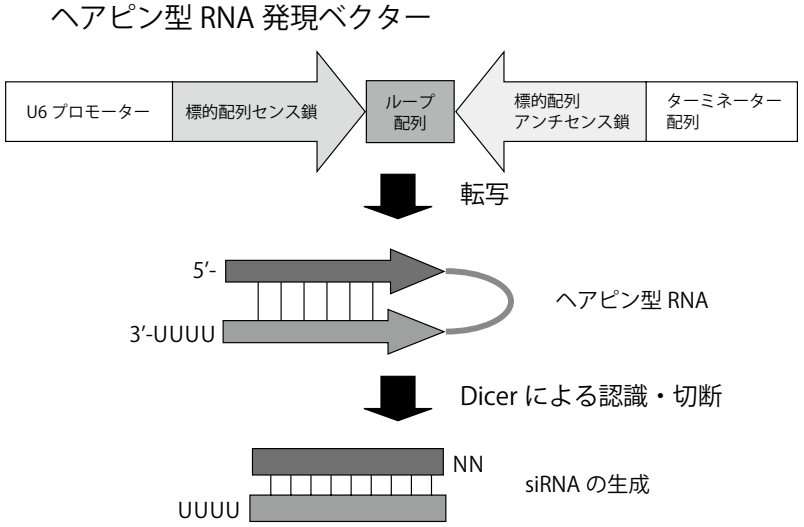


※ シーケンス上、1,259 の位置（プロモーター上流、*Hin*d III と *Eco*R I の間）に *Cla* I サイトがあるが、通常の *dam*$^+$ 大腸菌株で調製したプラスミドは、dam methylase による影響を受けるため、1,259 位置の *Cla* I サイトは切断されない。

構築した siRNA 発現レトロウイルスベクタープラスミドを、Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho（製品コード 6160/6161）を用いて 293 細胞や 293T 細胞に一過性トランスフェクションすることにより、短時間で siRNA 発現組換えレトロウイルスを得ることができます。
（注意）
siRNA 発現レトロウイルスベクタープラスミドの場合、一般的なパッケージング細胞を用いて薬剤選択により安定発現株を取得しても、あまり高いウイルス産生を示さない場合が多いようです。一過性のトランスフェクションにより、ウイルス産生を行うことをお勧めいたします。

siRNA 発現組換えレトロウイルスは、ポリブレン法やレトロネクチン法により効率よく標的細胞に感染させることができますが、特に血球系の細胞にはレトロネクチン法が有効です。

pSINsi ベクターシリーズのレトロウイルスベクタープラスミドは 3′ LTR U3 領域のプロモーター活性を欠損させているため、逆転写後、染色体に組み込まれたプロウイルスの状態では 5′ LTR のプロモーター活性が消失し、プロウイルス由来の mRNA は転写されなくなっており、pol III 系のプロモーターからのヘアピン型 RNA と SV40 プロモーターからのネオマイシン耐性遺伝子のみが転写されます（下図参照）。発現したヘアピン型 RNA は細胞内の Dicer による分解を受けて siRNA となります。



pSINsi ベクターシリーズではプロモーターの異なる 3 種のプラスミドベクターを取り揃えています。標的細胞、実験目的に応じてベクターを選択してください。
pSINsi-hH1 DNA（製品コード 3660）：human H1 promoter（Accession S68670）を搭載。
pSINsi-hU6 DNA（製品コード 3661）：human U6 promoter（Accession X07425）を搭載。
pSINsi-mU6 DNA（製品コード 3662）：mouse U6 promoter（Accession X06980）を搭載。

【各ベクターの容量】　20 μg（500 ng/μl）

【各ベクターの形状】　10 mM　Tris-HCl, pH8.0
1 mM　EDTA

II. 保存　　－ 20℃

（適切に保存し、受け取り後 2 年を目途にご使用ください。）

III. 準備

III-1. ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成

ヘアピン型 RNA を発現させるためには、[Ligation 用の制限酵素サイト－標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列－ Ligation 用の制限酵素サイト] の順でデザインした合成 DNA をプロモーターの下流に挿入します。pSINsi ベクターのクローニングサイトは、上流側は *Bam*H I、下流側は *Cla* I です。

下図に示すような合成オリゴ DNA を作製してください（Top strand と Bottom strand の 2 本；N 部分が標的配列）。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基（G または A）が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入してください。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG（Boden *et al*.[1]）を挙げていますが、GTGTGCTGTCC（Miyagishi *et al*.[2]）も有用であることが確認されています。これ以外のヘアピンループとして、Lee *et al*.[3]、Paddison *et al*.[4]、Paul *et al*.[5]、Sui *et al*.[6] らによってそれぞれ異なった配列が報告されています。

ターミネーター配列には TTTTTT 配列を用います（T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まります）。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後には必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていないことを確認することが必要です。

	転写開始点＊				
	*Bam*H I ↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	*Cla* I
Top strand	5′-GATCC (G/A) NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN (C/T)	TTTTTT	AT-3′
Bottom strand	3′- G (C/T) NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN (G/A)	AAAAAA	TAGC-5′

＊：ターゲット配列の最初の塩基がGまたはAでない場合はターゲット配列の前にGまたはAを挿入すること。

III-2. 標的配列の選択

RNAi の効果は標的配列によって大きく異なります。タカラバイオでは独自のアルゴリズムを用いて、高い RNAi 効果が期待できる siRNA 配列を設計し合成するサービスを提供しています（siRNA Design Support System）。このシステムを、pSINsi シリーズを用いて siRNA 発現ベクターを構築する際にもご利用いただけます。弊社ウェブカタログより「siRNA 発現ベクター用インサート DNA 合成依頼書」をダウンロードして必要事項を記入し、FAX で送付してください。成功確率の高い配列を設計して DNA を合成し、そのままライゲーションにご使用いただける二本鎖オリゴヌクレオチド（「*Bam*H I サイト－標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列－ *Cal* I サイト」を有する Top strand と Bottom strand をアニーリングしたもの）として、配列情報とともにお届けします。ご自身で設計された配列をご使用になる場合は、選択した配列が他の遺伝子に作用しないことを BLAST 検索により確認してください。

ネガティブコントロールの例としては、標的配列をランダムシャッフル法などによってスクランブルしたものが挙げられます。スクランブル配列についても BLAST 検索し、他の遺伝子に作用しないことを確認してくだい。

IV. pSINsi vector へのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入

IV-1. 必要な器具・装置

ウォーターバス（サーマルサイクラーも可）、インキュベーター、アガロースゲル電気泳動装置

IV-2. 用意するもの

- 10 ×アニーリングバッファー：100 mM Tris-HCl（pH 8.0）、500 mM NaCl
- 制限酵素 *Bam*H I（製品コード 1010A）、*Cla* I（製品コード 1034A）、*Bln* I (*Avr* II)（製品コード 1022A）
- PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT（製品コード 5801A）
- DNA 断片回収用
  NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）など
- DNA Ligation Kit Ver.1（製品コード 6021）、DNA Ligation Kit Ver.2.1（製品コード 6022）、または DNA Ligation Kit <Mighty Mix>（製品コード 6023）
- コンピテントセル
  E. coli JM109 Competent Cells（製品コード 9052）、*E. coli* DH5α Competent Cells（製品コード 9057）、*E. coli* HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）など
  （注意：*dam* ⁻株は使用しないこと）
- LB Amp プレート（アンピシリン 100 μg/ml 含有）、LB Amp 液体培地（アンピシリン 100 μg/ml 含有）

IV-3. 二本鎖オリゴ DNA の調製

（1） 合成した相補オリゴ DNA（Top strand および Bottom strand）を終濃度 20 pmol/μl になるように 1 ×アニーリングバッファー中に添加する。

（2） サーマルサイクラーなどを用いて 95℃、5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25℃まで徐冷する。

IV-4. ベクターの調製

pSINsi vector	2 μg（4 μl）
*Bam*H I	10 units
Cla I	10 units
10 × K Buffer	2 μl
滅菌蒸留水	up to 20 μl

滅菌水で 20 μl に調製し、30℃、1 時間反応後、アガロースゲル電気泳動でスタッファー（約 920 bp）が切り出された断片（hU6/mU6 vector の場合：約 5.6 kb、hH1 vector の場合：約 5.4 kb）を回収する＊。回収断片はエタノール沈殿後、10 ～ 20 μl の TE バッファーに溶解する。通常、ライゲーションには 1 反応あたり 1 μl を用いる。

＊：ゲルからの DNA 断片の回収には、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up などをご使用ください。また、使用するアガロースは PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT 等、高純度のものを使用してください。

IV-5. ライゲーションおよびトランスフォーメーション

IV-5-1. DNA 溶液の調製

IV-4. で調製したベクター 1 μl にアニールした二本鎖オリゴ DNA 3 pmol 以上を加え、TE バッファーで液量を 5 μl にする。

IV-5-2. ライゲーション

［DNA Ligation Kit Ver.1 を用いる場合］

（1） DNA 溶液 5 μl に A 液 20 μl を加えてよく混合し、さらに B 液 5 μl を加えてよく混合する。

（2） 16℃、30 分間インキュベートする。

［DNA Ligation Kit Ver.2.1 を用いる場合］

（1） DNA 溶液 5 μl に I 液 5 μl を添加し、よく混合する。

（2） 16℃、30 分間インキュベートする。

［DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いる場合］

（1） DNA 溶液 5 μl に Ligation Mix 5 μl を添加し、よく混合する。

（2） 16℃、30 分間インキュベートする。

IV-5-3. トランスフォーメーション

（1） ライゲーション液10 μlを100 μlのコンピテントセルに加え、トランスフォーメーションする。

（2） LB Amp プレートにまき、37℃で 16 時間培養する。

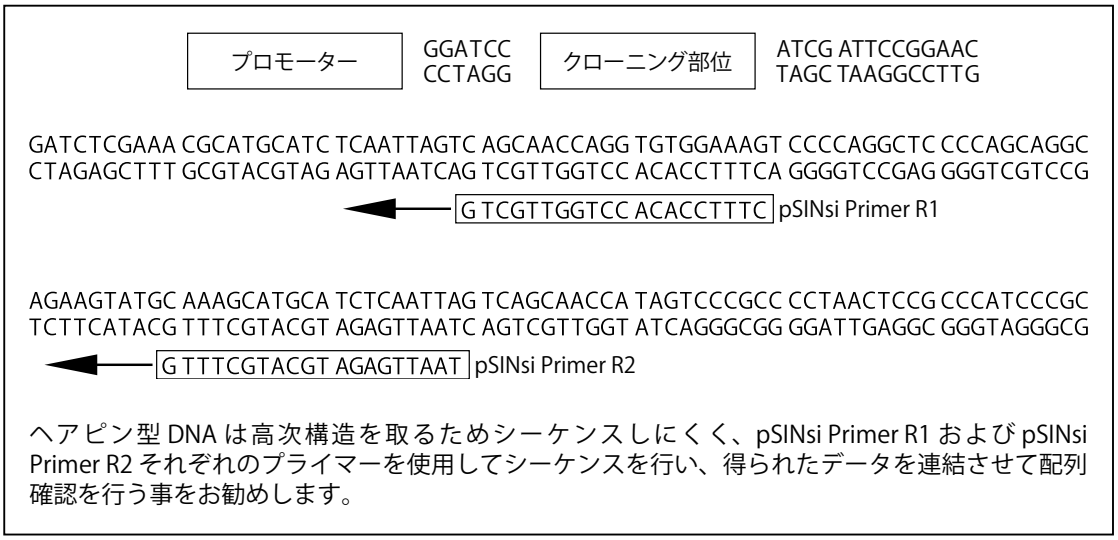
IV-6. インサートの確認

（1） IV-5-3. でトランスフォーメーションにより得られたコロニーを 2 ～ 5 ml LB Amp 液体培地で 37℃、16 時間培養し、プラスミドを調製する。

（2） プラスミド約 500 ng を *Bam*H I、*Bln* I で消化し、2%アガロースゲル電気泳動にて約 340 bp のバンドを確認する。通常、80 ～ 90%の確率で、合成オリゴ DNA 挿入クローンが得られる。

（3） 必要に応じて、シーケンスプライマー pSINsi Primer R1 および pSINsi Primer R2 を用いて塩基配列を確認する。

以下にシーケンスプライマーの部位を示す。


プロモーター
GGATCC
CCTAGG
クローニング部位
ATCG ATTCCGGAAC
TAGC TAAGGCCTTG
GATCTCGAAA CGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCAGG TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC
CTAGAGCTTT GCGTACGTAG AGTTAATCAG TCGTTGGTCC ACACCTTTCA GGGGTCCGAG GGGTCGTCCG
G TCGTTGGTCC ACACCTTTC pSINsi Primer R1
AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA TAGTCCCGCC CCTAACTCCG CCCATCCCGC
TCTTCATACG TTTCGTACGT AGAGTTAATC AGTCGTTGGT ATCAGGGCGG GGATTGAGGC GGGTAGGGCG
G TTTCGTACGT AGAGTTAAT pSINsi Primer R2

ヘアピン型 DNA は高次構造を取るためシーケンスしにくく、pSINsi Primer R1 および pSINsi Primer R2 それぞれのプライマーを使用してシーケンスを行い、得られたデータを連結させて配列確認を行う事をお勧めします。

IV-7. プラスミド DNA の大量調製

プラスミド DNA はパッケージング細胞などへのトランスフェクションに用いるので、高純度に精製されたものが必要である。pSINsi ベクターは high-copy プラスミドであり、25 ～ 40 ml の大腸菌培養液から約 100 μg のプラスミドが得られる。プラスミドは塩化セシウム密度勾配による超遠心や NucleoBond Xtra Midi（製品コード 740410.10/.50/.100）などによって精製し、滅菌蒸留水で無菌的に 1 mg/ml の濃度に溶解したものを用意しておく。

V. レトロウイルスベクターの産生

V-1. 必要な器具・装置および用意するもの

- Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho（製品コード 6160/6161）
- レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞（製品コード 6163）、293 細胞、293T 細胞など
- ゼラチンまたはコラーゲンコートプレート
- 5 ml ポリスチレン丸底チューブ
- 培地（DMEM 4.5 g/L Glucose, with L-Glutamine）
- Fetal Bovine Selum（FBS）
- 滅菌蒸留水
- Penicillin-Streptomycin Mixture
- ポリブレン（Hexadimethrine bromide, Aldrich, 8 mg/ml 水溶液）
- 力価測定用細胞（NIH/3T3 など）
- 電動ピペッター
- 0.45 μm 滅菌済みフィルター（低吸着タイプ）
- フィルター付滅菌済みチップ

V-2. ウイルス産生

前日

G3T-hi 細胞、293 細胞または 293T 細胞を 6 cm シャーレに 3×10^6 cells 播く。

1 日目（トランスフェクション）

（1） Retrovirus Packaging Kit の中からベクター（pGP、pE-eco/ampho）、クロロキン、必要数量のトランスフェクションバッファーを溶解する。
（2） トランスフェクションバッファー、滅菌蒸留水を室温に戻す。
（3） キットに添付のクロロキンを培地（10% FBS/DMEM）に 1,000 分の 1 量添加し、培地を 37℃で温めておく。
（4） 細胞が 70 ～ 80%コンフルエントであることを確認し、クロロキン入り培地 3 ml と交換する。
（5） DNA 混合液の調製（以下の溶液を 5 ml 容ポリスチレン丸底チューブで混合する。

pSINsi retrovirus vector（1 μg/μl 水溶液）	10 μl
pGP Vector	5 μl
pE-eco/ampho Vector	5 μl
2 M $CaCl_2$	62 μl
滅菌蒸留水	418 μl

（6） リン酸カルシウム沈殿の作製およびトランスフェクション
- トランスフェクションバッファー 500 μl をはかりとる（電動ピペッターを使用）。
- （5）の液に緩やかに加える（チューブを振りながら混ぜる）。添加後、直ちにピペッターの排出を利用してバブリングする（10 ～ 20 秒）。
- 1 ～ 2 分以内にシャーレに均一に滴下し、培地と混合する（長時間の放置は大きな結晶形成の原因となるためできるだけ避けること）。
- 37℃、5% CO_2 インキュベーターで培養する（7 ～ 11 時間）。
（顕微鏡観察で細胞に粉雪が降りかかったような状態が見えればリン酸カルシウム沈殿の形成は成功している。）
- （トランスフェクションから 7 ～ 11 時間後）シャーレから培地 3 ml を除き、新たに 10% FBS/DMEM を 4 ml 加える。

2 日目（トランスフェクションから 24 時間後）

培地を交換する（10% FBS/DMEM、4 ml）

3 日目（トランスフェクションから 48 時間後）

上清を 0.45 μm フィルターでろ過し、ウイルス液とする。調製したウイルス液は直ちに使用しない場合、小分けして－ 80℃保存し、凍結融解の繰り返しを避ける。293T 細胞を用いてウイルス生産した場合、10^5 ～ 10^6 cfu/ml 程度のウイルス力価が得られる。

V-3. ウイルス力価測定

（実施例）

前日

NIH/3T3 細胞を 6 穴プレートに 5 × 10^4 cells/well の密度で播く。

1 日目（感染）

ウイルスストックの溶解、希釈および感染

（1） － 80℃で保存したウイルス液を 37℃水浴中で速やかに溶かし、溶解後は氷上で保持する。

（2） 希釈系列の作製
ウイルス液はマイクロチューブ中で 10%ウシ血清入り DMEM を用いて 10 倍、10^2 倍、10^3 倍、10^4 倍、10^5 倍に希釈する。希釈液は各段階 200 μl 以上用意する。

（3） NIH/3T3 細胞の培地を 8.9 μg/ml のポリブレン含有 10%血清培地 900 μl と交換する。

（4） 10 倍、10^2 倍、10^3 倍、10^4 倍、10^5 倍に希釈したウイルス液 100 μl を各ウェルに添加し、感染させる。
（ここでウイルス液の最終希釈段階は 10^2 倍、10^3 倍、10^4 倍、10^5 倍、10^6 倍になり、ポリブレン濃度は 8 μg/ml となる。）

（5） 感染から 4 ～ 6 時間後、各ウェルに 10%血清培地 1 ml を添加する。

2 日目以降

（6） 感染から 24 時間後、G418 を 500 μg/ml 含有する 10%血清培地 2 ml と交換する。
（培地交換するときに細胞が乾かないように注意すること。）

（7） 以後、3 日～ 4 日ごとに G418 含有培地を交換し、9 ～ 12 日間培養する。

10 ～ 14 日目（コロニー染色）

コロニーが生育してきたところでコロニーをギムザ液やメチレンブルーなどで染色する。

［染色方法例：メチレンブルー染色］

用意するもの

- PBS
- 0.2%メチレンブルー／メタノール溶液

工程

- プレートから培地を吸引除去し、1 ウェルあたり 1 ml の PBS を添加し、PBS を吸引除去する。
- プレートの蓋を安全キャビネット内で開け、キャビネットのファンで風乾させる。
- プレートが完全に乾いたら、1 ウェルあたり 0.5 ml の 0.2% メチレンブルー／メタノール溶液を添加して 10 分間染色する。
- メチレンブルー染色液を除き、ウェルを水洗し、乾燥させる。
- 青く染まったコロニーの数を計数し、10 ～ 100 個の範囲で得られた値に希釈倍率を乗じた値を力価（cfu/ml）とする。

※ Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)（製品コード 6166）を用いると、リアルタイム RT-PCR により迅速に力価（RNA タイター）を測定することが可能である。

VI. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験

VI-1. 必要な器具・装置（VI-2、VI-3 共通）

- CO_2 インキュベーター
- 細胞観察用顕微鏡
- 細胞培養用シャーレ
- 安全キャビネット
- 電動ピペッター
- フィルター付滅菌済みチップ

VI-2. RetroNectin を用いる場合

VI-2-1. 用意するもの

RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment)（製品コード T100A/B）およびノントリートメントタイプの培養容器、2% BSA/PBS 溶液、PBS または RetroNectin Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mmφ)（製品コード T110A）

VI-2-2. 準備（RetroNectin Dish を用いる場合には不要）

ノントリートメントタイプの培養容器に RetroNectin をコーティングし、2% BSA/PBS 溶液でブロッキング後、PBS または Hank's 緩衝液で洗浄する（詳細は RetroNectin の取扱説明書参照）。

VI-2-3. 感染

（1） RetroNectin をコートしたプレートにウイルス液を 125 ～ 250 μl/cm^2 加え、32℃または 37℃の CO_2 インキュベーターで 3 ～ 5 時間インキュベートする。*

＊：レトロウイルスベクターの力価が低い場合や、より高効率に細胞への遺伝子導入を行いたい場合には、遠心による RetroNectin 上へのウイルス結合法が有効です。詳細は RetroNectin の取扱説明書をご覧ください。

（2） 増殖期にある細胞を回収し、新しい増殖培地で 0.2 ～ 1×10^5 cells/ml になるように懸濁する。

（3） 感染の直前に RetroNectin プレートからウイルス液を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄する。プレートが乾かないように注意すること。

（4） 洗浄後直ちに細胞をプレートに添加する。播種密度は、細胞の大きさや増殖速度によって異なるが、一般的に推奨される密度は 0.5 ～ 2.5×10^4 cells/cm^2 である。

VI-3. ポリブレンを用いる場合

VI-3-1. 用意するもの

ポリブレン（8 mg/ml 水溶液）

VI-3-2. 準備

感染の前日に細胞を組織培養用シャーレに播種する。播種密度は、細胞の大きさや増殖速度によって異なるが、一般的に推奨される密度は 0.5 ～ 2.5×10^4 cells/cm^2 である。血球系の浮遊細胞は一般的にポリブレン法での遺伝子導入効率が悪いため RetroNectin 法が推奨される。

VI-3-3. 感染

（1） ウイルス液に 1,000 分の 1 量のポリブレンを添加し、8 μg/ml のポリブレンを含有するウイルス液を用意する。ウイルス液は原液を使用すると感染阻害がおこる可能性があるため、増殖培地で 3 ～ 4 倍以上に希釈したものを用いる。

（2） プレートから培地を吸引除去し、速やかにポリブレンを含有するウイルス液 125 ～ 250 μl/cm^2 加え CO_2 インキュベーターで培養する。

（3） 4 ～ 6 時間後、ポリブレンを希釈するため必要に応じて増殖培地を添加する。ポリブレンへの感受性が高い細胞株の場合には新しい増殖培地と交換する。

VI-4. 遺伝子導入細胞の選択

pSINsi ベクターはマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を搭載しているため、遺伝子導入細胞を G418 で選択することができる。G418 選択は感染後 24 時間以上経過してから開始し、3 ～ 4 日ごとに G418 培地を交換する。RetroNectin 法で感染した接着系の細胞の場合には、組織培養用培養器に細胞をまきなおしてから G418 選択を行う。G418 選択開始後約 2 週間で遺伝子導入細胞が得られる。細胞によって G418 に対する感受性は異なるので、あらかじめ使用する細胞に適した G418 濃度を決定しておく。

VII. 関連製品

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho（製品コード 6160/6161）
レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞（製品コード 6163）
Retrovirus Constructive System Eco/Ampho（製品コード 6164/6165）
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)（製品コード T100A/B）
RetroNectin® Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mmφ)（製品コード T110A）
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)（製品コード 6166）
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT（製品コード 5801A）
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）
NucleoBond Xtra Midi（製品コード 740410.10/.50/.100）
DNA Ligation Kit Ver.1（製品コード 6021）
DNA Ligation Kit Ver.2.1（製品コード 6022）
DNA Ligation Kit ＜ Mighty Mix ＞（製品コード 6023）
E. coli JM109 Competent Cells（製品コード 9052）
E. coli DH5 α Competent Cells（製品コード 9057）
E. coli HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）
*Bam*H I（製品コード 1010A）
Cla I（製品コード 1034A）
Bln I (*Avr* II)（製品コード 1022A）
pSINsi-DK I DNA Set（製品コード 3663）
pSINsi-DK II DNA Set（製品コード 3664）

VIII. 参考文献

1）Boden *et al*. (2004) *Nucleic Acids Res*. **32**: 1154-1158.
2）Miyagishi *et al*. (2004) *J Gene Med*. **6**: 715-723.
3）Lee *et al*. (2002) *Nat Biotech*. **20**: 500-505.
4）Paddison *et al*. (2002) *Genes and Dev.* **16**: 948-958.
5）Paul *et al*. (2002) *Nat Biotech*. **20**: 505-508.
6）Sui *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 5515-5520.
7）Kawasaki H. *et al*. (2003) *Nucleic Acids Res*. **31**: 700-707.

IX. 注意

- 本製品は、研究用試薬です 。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。（本製品により得られた生物材料を第三者へ譲渡することもできません。）

- 本製品を研究目的以外に使用される場合は、事前に弊社にお問い合わせください。

- レトロウイルスベクターの系によって生産されるウイルス上清液は挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組み換えレトロウイルスの産生と取扱には、適切な処置が必要です。ご利用の際は、管轄省庁および組織内の安全委員会の組換えDNA 実験指針に従って実施してください。

- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますのでご了承の上本製品をご使用ください。

- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

- RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201510Da